



Kandidaatintutkielma

# Syöpäsolun erilainen energia-aineenvaihdunta

Susa Savukoski

## Sisällysluettelo

1. Solun energia-aineenvaihdunnan yleiset piirteet	
1.1 Oksidatiivinen fosforylaatio mahdollistaa tehokkaan energiantuoton.....	3
1.2. Hiilihydraatit ja rasvahapot tärkeimpinä energianlähteinä.....	4
1.3. Aminohappojen metaboliasta.....	4
1.4. Nukleiinihappojen metaboliasta.....	5
1.5. ATP-molekyylin pitoisuus säätelee energiantuoton tehokkuutta.....	5
2. Anaerobinen reaktioreitti tuottaa laktaattia.....	6
2.1. Laktaattisukkulan toiminta.....	7
2.2. Laktaatti osana urheilusuoritusta.....	7
3. Syöpäsolun erikoisuuksia.....	8
3.1. Otto Warburgin teoria aerobisesta glykolyysista.....	9
3.2. Metabolisten reittien uudelleen ohjelmointi; PI3K-signaali-reitti.....	10
3.2.1. c-Myc transkriptiotekijät.....	13
3.2.2 HIF-1 transkriptiotekijät.....	15
3.3. Syöpäsolujen laktaattisynteesin säätelystä.....	18
3.3.1. FGFR1-tyrosiinikinaasi-reseptori.....	19
3.3.2. HER2-tyrosiinikinaasi-reseptori.....	22
3.4. Soluväli tilan happamoitumien.....	22
4. Johtopäätökset.....	24
5. Lähteet.....	26

## **1. Solun energia-aineenvaihdunnan yleiset piirteet**

Monisoluisuus on mahdollistanut solujen erikoistumisen monenlaisiin tehtäviin. Eri solutyypit muodostavat toimivan kokonaisuuden tehokkaan viestintäjärjestelmän avulla. Solut kykenevät vastaamaan ulkoisiin viesteihin säätelemällä omaa toimintaansa aina tilanteen vaatimalla tavalla. Vaikka solujen tehtävät poikkeavat toisistaan, jokaisella on eukaryoottisolulle tyypillinen rakenne. Solun sisällä organelit ovat järjestäytyneen omiksi osastoikseen mahdollistaen solun tehokkaan toiminnan. Mitokondriot ovat erikoistuneet solun energiantuottoon, joka on täysin ulkopuolisesta ravinnosta riippuvaista. Energianlähteenä toimivat ravinnon hiilihydraatit, rasvat ja proteiinit hajotetaan pienempiin osiin, jolloin ATP-energiaa saadaan solun kasvuun ja kehitykseen. Solusykli on jaettu neljään osaan, jota erilaiset säätelytekijät säätelevät. Solunjakaantuminen edellyttää DNA:n kahdentumisen ja uuden solun rakennuspalikoiden synteesin. Anaboliset ja kataboliset reaktioreitit ovat tiukasti kytkeytyneinä toisiinsa, sillä vapaan energian määrä vaikuttaa reaktioreittien säätelyyn. Anabolisin reaktioreitteihin kuuluu erilaisten biomolekyylien kuten uusien rasvahappojen synteesi sytoplasmassa. Rasvahappojen hajotus eli beta-oksidatio on taas katabolinen reaktioreitti, joka aktivoituu vapaan energian ollessa vähissä. Solun energia-aineenvaihdunta on hyvin keskeinen mutta monimutkainen kokonaisuus, jonka selvittäminen on ollut tärkeää solun toiminnan ymmärtämisen kannalta. (Heino and Vuento, 2015)

### **1.1. Oksidatiivinen fosforylaatio mahdollistaa tehokkaan energiantuoton**

Eukaryoottisolua vaatii hapetta tehokkaan energiantuoton ylläpitämiseen. Ensimmäiset energia-aineenvaihdunnan reitit käyttävät hapetuksessa apunaan kofaktoreita, jotka vastaanottavat vedyt ja elektronit eli pelkistyvät. Glykolyysistä ja trikarboksyylihappokierrosta ei kuitenkaan yksinään saada tarpeeksi energiaa kattamaan koko solun energiatarvetta. Anaerobisissa olosuhteissa pelkistyneitä NADH-molekyyliä kertyy, sillä niitä ei saada hapetettua takaisin yhtä tehokkaasti kuin niitä muodostuu. Tästä syystä vaihtoehtoisia reaktioreittejä kuten laktaattikiertoa pystytään hetkellisesti hyödyntämään kofaktoreiden regeneroimisessa. Kuitenkin vasta oksidatiivinen fosforylaatio mitokondrion sisäkalvolla mahdollistaa NADH-molekyylien tehokkaan uudelleenhapettamisen ja ATP-energiantuoton. Vaiheittain tapahtuva elektroninsiirtoketju sisäkalvon proteiinien, elektroninsiirtäjämolekyylien ja sytokromi c:n välityksessä mahdollistaa protonien kulkeutumisen matriksin puolelta sisä- ja ulkokalvojen väliseen tilaan. Muodostuva protonigradietti mitokondrion sisäkalvon eri puolilla pyörittää ATP-syntaasikoneistoa ja aikaansaa protonien takaisinvirtaamisen mitokondrion matriksiin. Glykolyysissä energiantuottaminen perustuu ADP-molekyylin fosforylointiin fruktoosi-1,6-bisfos-

faatin avulla. Trikarboksyylohappoketjun tarkoituksen on tuottaa runsaasti pelkistyneitä elektroninsiirtäjiä ja muita yhdisteitä erilaisten biosynteesien lähtöaineiksi. (Heino and Vuento, 2015)

## **1.2. Hiilihydraatit ja rasvahapot tärkeimpinä energianlähteinä**

Ravinnosta saatavat hiilihydraatit ja rasvahapot toimivat erinomaisina energianlähteinä. Monimutkaiset yhdisteet hajotetaan solun entsyymien toimesta pienemmiksi yksiköiksi, joita voidaan hyödyntää energia-aineenvaihdunnan reittien lähtöaineina. Glukoosista saadaan solun sytoplasmassa pyruvaattia, joka toimii lähtöaineena asetyyli-koA:n synteesissä. Samalla tuotetaan nettona kaksi ATP-molekyyliä ja NADH:ta. Rasvahappojen beta-oksidatiossa saadaan myös lopputuotteena asetyyli-koA:ta sekä NADH:ta ja FADK<sub>2</sub>:ta. Hiilihydraattien ja rasvahappojen hajoamisreitit tuottavat molemmat asetyyli-koA:ta, joka toimii trikarboksyylihappokierron lähtöaineena. Tästä syystä solut eivät ole täysin riippuvaisia vain yhdestä energianlähteestä, vaan voivat hyödyntää useampaa reaktioreittiä. Molemmista yhdisteistä on olemassa myös varastomuodot; glukoosista glykogeneeni ja rasvoista adiposyyttien triasyyliglyserolit, joilla elintärkeiden elinten energiansaanti pyritään varmistamaan. Rasvahapoista voidaan valmistaa myös ketoaineita, joita erityisesti aivot voivat hyödyntää glukoosin puutteessa. (Heino and Vuento, 2015)

## **1.3. Aminohappojen metaboliasta**

Ruuasta saatavat proteiinit hajotetaan aminohapoiksi, joita hyödynnetään uusien proteiinien rakennuspalikoina, hormonien sekä muiden tärkeiden yhdisteiden lähtöaineina. Aminohappojen rakenteessa on amino- ja karboksyyli-ryhmän lisäksi jokaiselle ominainen sivuryhmä, joka määrittelee kunkin aminohapon tehtävän solussa. Aminohappojen hajotuksessa toimii maksan ureasykli, jossa myrkyllinen aminotyyppi poistetaan ja hiilirunko saadaan talteen energiantuottoa tai biomolekyylien synteesiä varten. Aminohappojen aineenvaihdunta kytkeytyy muun muassa pyruvaatin,  $\alpha$ -ketoglutaraatin ja oksaloasetaaatin reaktioreitteihin. Glykogeeniset aminohapot ovat muunnettavissa täysin tai osittain glukoosiksi, mikä mahdollistaa proteiinien käytön energianlähteenä pitkittyneessä nälänhädässä. Ketogeenisiä aminohapoista saadaan asetyyli-koA:ta ja asetoasetattia, jotka voidaan edelleen syntetisoida glukoosiksi. Normaalisti ruuasta saatujen välttämättömien aminohappojen tarkoitus on kuitenkin toimia hermostolle ja aivoille välttämättömien yhdisteiden lähtöaineina eikä energianaineenvaihdunnan pääkomponentteina. (Heino and Vuento, 2015)

#### 1.4. Nukleiinihappojen metaboliasta

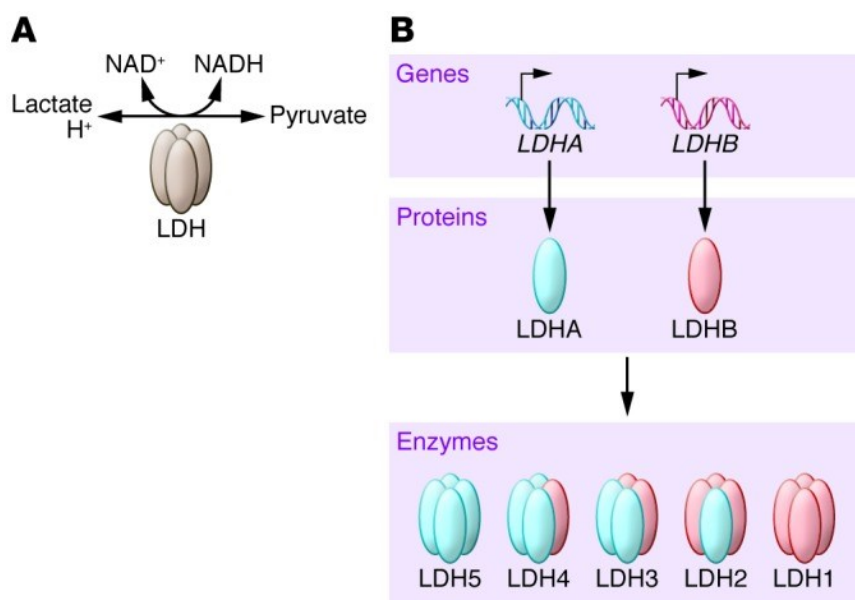
Solunjakautumista edeltää perintöaineksen kahdentuminen, johon tarvitaan nukleiinihappojen synteesiä. Solut kykenevät hyödyntämään talteenottoreittien avulla jo olemassa olevia nukleotidien emäksiä tai syntetisoimaan ne alusta asti itse. Uusien emäksien synteesi hyödyntää glukoosi-6-fosfaatin pentoosifosfaattireaktioreittiä (PPP), joista saadaan aktivoitu riboosi-5-fosfaatti sekä NADPH:ta, jota tarvitaan esimerkiksi rasvahappojen biosynteesissä sekä RNA:n riboosisokerin pelkistymisessä DNA:n deoksiriboosiksi. Pentoosisokeriin liittyy puriini- tai pyrimidiinirengas syntetisoitavan emäksen perusteella, ja näiden rengasrakenteiden synteesitreffit eroavat toisistaan. Puriinirenkaan typpimolekyylit saadaan glutamiinilta, glysiiniltä ja aspartaatilta. Monimutkaisen reaktioreitin tuotteena saadaan inosinaatti (IMP), joka toimii adenylaatin (AMP) ja guanylaatin (GMP) prekursorina. Pyrimidiinirenkaan synteesi alkaa aspartaatin ja karbamyylifosfaatin yhteenliittämällä, ja etenee riboosisokerin liittymisen kautta uridylaattiin (UMP) ja sytidinitrifosfaattiin (CTP). DNA:n tymiini-emäksen synteesi tapahtuu tymidylaattisyntaasin avulla metyyli ryhmän liittyessä deoksiuridylaattiin (dUMP). Monimutkainen nukleiinihappojen biosynteesi vaatii ATP-energiaa ja glykolyysin, pentoosifosfaattireaktioreitin ja aminohappojen metaboliareittien hyödyntämistä, minkä johdosta de novo -synteesi vaatii riittävän energiansaannin. (Heino and Vuento, 2015; Lane and Fan, 2015)

#### 1.5. ATP-molekyylin pitoisuus säätelee energiantuoton tehokkuutta

Solun energiantuotto ja -varastoiminen ovat tarkoin säädeltyjä prosesseja. ATP:n, ADP:n ja AMP:n pitoisuudet kertovat solun energiatilasta, minkä vuoksi kyseiset yhdisteet pystyvät suoraan aktivoimaan tai inhiboimaan energiantuotannossa vaadittavien entsyymien toimintaa. Glykolyysin fosfofruktokinaasi 1 on allosteerinen entsyymi, jonka avulla solu tekee päätöksen energiantuottamisen tarpeesta. Muita tärkeitä säätelyentsyymejä ovat esimerkiksi glykolyysin pyruvaattikinaasi, pyruvaattidehydrogenaasikompleksi sekä useat TCA:n entsyymit, jotka pyrkivät pitämään katabolisten ja anabolisten reaktioreittien suhteelliset osuudet solun tarpeiden mukaisina. Trikarboksyylihappokierron lähtöaineen oksaloasetaatin pitoisuus sekä hapettuneiden koentsyymien saatavuus määrittelee usein kierron aktivaatiota. Energiantuoton säätelyn lisäksi solu säätelee varastoidun energian purkamista solun käyttöön. Esimerkiksi glukagonin ja adrenaliinihormonin pitoisuuden noustessa glukogeenifosforylaasi pilkkoo glykogeenia muiden entsyymien ohella maksan ja lihaksen varastoista. (Heino and Vuento, 2015)

## 2. Anaerobinen reaktioreitti tuottaa laktaattia

Soluilla on vaihtoehtoinen reaktioreitti glykolyysin ylläpitämiseksi oksidatiivisen fosforylaation toimiessa tehottomasti. Tällainen tilanne havaitaan hapenpuutteesta kärsivissä soluissa tai esimerkiksi punasoluissa, jossa ei ole mitokondrioita ollenkaan. Punasolut käyttävät glukoosia ainoana energianlähteenään, joten glykolyysin ylläpitäminen on niille erityisen tärkeää. Laktaattidehydrogenaasi (LDH) syntetisoi laktaattia pyruvaatista, ja regeneroi samalla pelkistyneitä NADH-molekyylejä takaisin  $\text{NAD}^+$ :ksi. Glykolyysin toinen vaihe tarvitsee hapettuneita kofaktoreita toimiakseen (Heino and Vuento, 2015). Entsyymistä on viisi erilaista aktiivista tetrameeri-rakennetta, jotka koostuvat A ja B -alayksiköistä (kuva 1). Esiintymisalue ja tehtävä määrittelevät entsyymien alayksiköiden tyypit. Lähinnä A-alayksiköistä koostuvat entsyymit tuottavat enemmän laktaattia, kun taas lähinnä B-alayksiköistä koostuvat entsyymit muodostavat pyruvaattia, joka voidaan hyödyntää sitruunahappokiertoon kuljetettavaksi asetyyli-koA:ksi. LDH5 koostuu neljästä A-alayksiköstä, jotka ekspressoitetaan erityisesti glykolyttisissä kudoksissa kuten luustolihasissa. Tästä syystä A-alayksiköstä käytetään myös nimitystä M-alayksikkö viitaten sen pääsäännölliseen esiintymisalueeseen lihakseen. LDH1 koostuu neljästä B-alayksiköstä ja esiintyy erityisesti sydänlihaksessa, neuroneissa, maksassa ja munuaisissa. Näissä soluissa pystytään hyödyntämään laktaatin hiilirunkoa energianlähteenä tai muodostamaan siitä uutta glukoosia glukoneogeneesin avulla. B-alayksiköstä puhutaan myös H-alayksikkönä, sillä kyseinen geeni ekspressoitetaan ja toimii hallitsevana muotona sydänlihaksessa (Doherty and Cleveland, 2013)



Kuva 1. Laktaattidehydrogenaasin (LDH) viiden isoentsyymien muodostuminen kahdesta alayksiköstä A ja B. LDH5:sen tetrameeri-rakenne koostuu neljästä LDHA-alayksiköstä, kun taas LDH1:sen tetrameeri-rakenne koostuu neljästä LDHB-alayksiköstä. Kolmen muun isoentsyymien rakenteet muodostuvat molemmista alayksiköistä erilaisina yhdistelminä. Entsyymien rakenteella on merkitystä laktaatin synteesin ja pyruvaatin synteesin todennäköisyyksissä. LDH5 syntetisoi mielellään laktaattia, kun taas LDH1 syntetisoi mielellään pyruvaattia. Isoentsyymit sijaitsevat eri kudoksissa johtuen niiden erilaisesta fysiologiasta. Kuva ja tieto peräisin (Doherty and Cleveland, 2013).

## 2.1. Laktaattisukkulalan toiminta

Syntetisoitu laktaatti eritetään ulos solusta monokarboksylaattikuljettajien (MCT) avulla. Kyseinen kalvoproteiini kuljettaa laktaatin ja protonin yhdessä soluun tai solusta ulos, eli toimii symportterina säädellen solun pH-tasapainoa. MCT proteiiniperheeseen kuuluu ainakin 14 eri isoentsyymiä, joista neljä vaatii protonin sitoutumisen. Kaikilla on yhtäläisiä rakenteellisia ominaisuuksia, joista ne tunnistetaan. Esimerkiksi kahdestatoista  $\alpha$ -heliksistä koostuva transmembraanidomeeni kiinnittää kyseiset MCT solukalvolle. Proteiineilla on konservoituja motiiveja, jotka mahdollistavat niiden konformaation muutoksen kuljetuksen mahdollistamiseksi. MCT1-4 voivat kuljettaa laktaatin lisäksi muun muassa pyruvaattia, butyraattia ja asetoasettaattia. MCT4:lla on suurempi affiniteetti pyruvaatille kuin laktaatille, mikä kertoo sen edistävän pyruvaatin kuljetusta soluun laktaatin synteesiä varten (Jones and Morris, 2016). Laktaatin tapauksessa kuljettajan tyyppi vaihtelee sen esiintymisalueen ja tehtävän mukaan. MCT1 on ekspressoitu useissa eri kudoksissa, mutta pieninä määrinä. MCT2 kuljettaa laktaattia erityisesti maksaan, munuaisiin ja neuroneihin. MCT3 on spesifisempi silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelissä ja suonikalvolla. MCT4 on hyvin yleinen luustolihasissa, sillä laktaattia tuotetaan ja eritetään runsaasti erityisesti urheilusuorituksen aikana. Aikaisemmin laktaatin ajateltiin olevan sivutuote, jolla ei ollut erityistä merkitystä solujen aineenvaihdunnassa hapen läsnäollessa. Nykyään tiedetään, että laktaatti toimii yleisesti energianlähteenä, glukoneogeneesin lähtöaineena ja solujen viestintämolekyylinä. Laktaattia voidaan kuljettaa solun sytoplasmasta organelleihin, solusta viereiseen soluun tai solusta toiseen kudokseen verenkierron välityksellä. Kyseistä kuljetustapahtumaa kutsutaan laktaattisukkulaksi. Se tehostaa glukosista riippuvaisten solujen energiansaantia, sillä laktaatin muuttaminen pyruvaatiksi, ja pyruvaatin hyödyntäminen lopulta oksidatiivisessa fosforylaatiossa ATP-energiaksi, on hyvin yleistä esimerkiksi aivosoluissa. Solujen välillä vallitsee tiivis yhteistyö laktaattia tuottavien ja laktaattia hyödyntävien osapuolten välillä (Brooks, 2018; Doherty and Cleveland, 2013).

## 2.2. Laktaatti osana urheilusuoritusta

Kovatehoisen urheilusuorituksen aikana lihassolut tuottavat normaalia enemmän laktaattia. Intensiivisen lihastyön aikana solut kärsivät hetkellisesti hapenpuutteesta, sillä happea kulutetaan enemmän kuin sitä saadaan hengitysilman mukana. Aikaisemmin on uskottu, että lihassolujen ja ympärillä olevien verisuonten happamoituminen johtuu yksinomaan maitohapon luovuttamasta protonista ja natriumsuolan muodostumisesta. Tutkijat eivät ole kuitenkaan pystyneet todistamaan laktaatin kertymisen olevan yksinään riittävä tekijä solujen asteittaiseen pH:n laskuun. Kun mitokondrion oksidatiivinen fosforylaatio toimii oikein, muodostuneet protonit voidaan hyödyntää mitokondrion kalvojen protonigradientin luomiseen ja ATP-synteesiin. Soluilla on kyky vastustaa pH:n muutosta esimerkiksi aminohappojen ja proteiinin

amfolyyttisten happo-emäs-rakenteiden avulla. Myös laktaatin synteesireitti sekä kreatiinifosfaatin hajottaminen sitovat vapautuneita protoneja ympäristöstä. Laktaattidehydrogenaasin syntetisoima reaktio vapauttaa yhden protonin NADH:n hapettuessa, mutta sitoo kaksi protonia pyruvaatin muuttuessa laktaatiksi. Reaktion nettokulutuksena on yksi protoni, minkä vuoksi reaktio toimii päinvastoin happamoitumista vastustavana reaktioreittinä. Kreatiini-naasi muodostaa ATP:tä siirtämällä fosfaattiryhmän kreatiinifosfaatilta ADP:lle. Kreatiinifosfaatti toimii emäksenä fosfaattiryhmän luovuttamisen jälkeen, sillä sen negatiivisesti varautunut typpi atomi vastaanottaa mielellään protonin amiiniryhmänsä palauttamiseksi. Kreatiinifosfaatin hyödyntäminen energianlähteenä on hyvin lyhytaikaista, mutta tärkeää suorituksen ensimmäisten sekuntien aikana. Lihastyön jatkuessa pidempään glukoosin tai glykokeenin hajotuksesta peräisin olevat hiilirungot ja niistä vapautuneet ATP-molekyylit otetaan käyttöön pääsääntöisenä energianlähteenä. Tällöin solujen happamoituminen voi alkaa, jos mitokondrioiden kyky hyödyntää muodostuneita protoneja ei ole riittävän tehokas. Mitokondrion ulkopuolisen ATP-energian hyödyntäminen lisää vapaiden protonien muodostumista, ja kertyneen laktaatin pitoisuus on hyvä mittari happamoitumisen tilasta. Laktaatin tehokas synteesi parantaa lihasten suorituskykyä, sillä muodostuneet protonit sidotaan hiilidioksidiksi, joka happamoitumisen lisäksi parantaa solujen hapensaantia hengityksen tehostuttua. (Ghiasvand et al., 2004)

### 3. Syöpäsolun erikoisuuksia

Pahanlaatuinen syöpäsolu ei ota vastaan ulkoisia viestejä, vaan kasvaa ja jakaantuu hallitsemattomasti ympäröivään kudokseen. Solun muuttuminen syöpäsoluksi vaatii useamman erigeenimutaation, mahdollisia muutoksia geenin säätelyalueissa ja DNA:n korjausmekanismeissa. Proto-onkogeenien aktivoiminen voi johtaa syöpäsolun syntyyn, sillä normaalisti nämä proteiinit edistävät solun kasvua. Liiallinen aktiivisuus johtaa usein solun hallitsemattomaan kasvuun ja jakautumiseen, mikä edesauttaa mutaatioiden kertymistä uusiin tytärsoluihin. Kasvurajoitegeenien, kuten p53, hiljentäminen lisää myös osaltaan syöpäsolujen kasvua. Syöpäsolu ei etene apoptoosiin, sillä apoptoosia säätelevä koneisto on vaurioitunut. Telomeraasin aktiivisuuden lisääntyessä solujen DNA-jaksot eivät lyhene samalla tavalla kuin normaalisti jakaantuissa soluissa. (Heino and Vuento, 2015)

Uudet tutkimukset antavat jatkuvasti lisää tietoa syöpäsolujen geneettisistä ja ei-geneettisistä muutoksista. Ei-geneettisillä muutoksilla tarkoitetaan syöpäsolun muuttuvaa kasvuympäristöä, joka on riippuvainen solussa tapahtuvista geneettisistä muutoksista. Kasvavan solumassan ympärillä kasvuolosuhteet harvoin pysyvät muuttumattomina. Solut tarvitsevat normaalia enemmän energiaa sekä happea, joita saadaan ympäröivistä verisuonista diffuusion

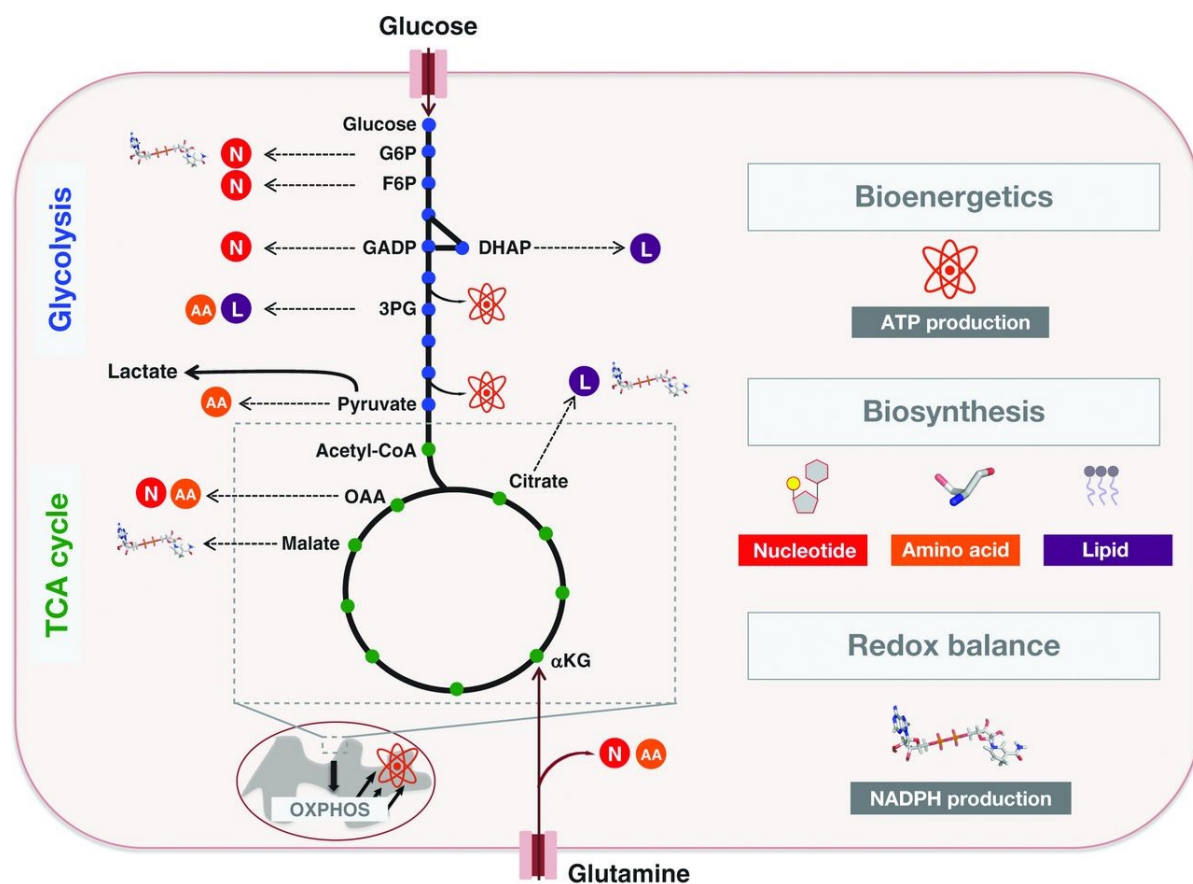


ja aktiivisen kuljetuksen avulla. Solujen aineenvaihdunnan muutokset vaikuttavat pH-tasapainoon sekä protonigradientin ylläpitoon. Syövän hoitamisen haasteista kohdistuu juuri syövän mutkikkaaseen geneettisten ja ei-geneettisten tekijöiden yhteisvaikutukseen, jota on hankala ennustaa. Syöpäsoluilla havaitaan yhteisiä geenimutaatioita, mutta ne eivät yksinään riitä tehokkaan hoitokeinon tarjoamiseen. Soluilla on kyky kiertää niiden kasvua rajoittavia tekijöitä muuntelemalla aktiivisesti omaa toimintaansa, kuten metaboliaansa. Esimerkiksi hapenpuutteesta kärsivät syöpäsolut tehostavat angiogeneesiä eli uusien verisuonten muodostumista. Tällöin kasvua rajoittava stressitila helpottuu, ja solu kykenee kasvamaan ja jakautumaan tehokkaammin. Tieto eri kudostyyppien syöpäsolujen erityispiirteistä auttaa uusien hoitokeinojen kehittämisessä. On kuitenkin havaittu, että syöpäsolut voivat muunnella jopa hyvin pienen alueen sisällä, mikä kertoo solujen nopeasta reagoitokyvystä vasteena ulkopuolisiin rajoitteisiin. (Cantor and Sabatini, 2012)

### **3.1. Otto Warburgin teoria aerobisesta glykolyysistä**

Syöpäsolujen energia-aineenvaihdunta on sopeutunut vastaamaan nopeasti jakaantuvien solujen tarpeita. Solut tarvitsevat glukoosia enemmän kuin normaalisti, minkä vuoksi sitä kuljetetaan tehokkaasti soluun. Aerobiseksi glykolyysiksi kutsutussa tapahtumassa glykolyysi ja laktaatin muodostuminen ovat tehostuneet, vaikka happea on läsnä ja mitokondriot ovat toimintakykyisiä. Glykolyysi tuottaa vain pienen osan oksidatiivisen fosforylaation avulla tuotetusta ATP-energiasta, mutta silti useiden syöpätyyppien metabolia on ajautunut tehostamaan kyseistä reaktioreittiä. Kineettisesti ATP-tuotanto on glykolyysin avulla paljon nopeampaa, vaikka sen tehokkuus jää oksidatiivisen fosforylaation ATP-tuotannosta paljon pienemmäksi. Warburgin havainto on herättänyt paljon kiinnostusta jo yli 90 vuoden ajan, sillä syöpäsolun erilainen aineenvaihdunta voisi ratkaista syövän hoitamisen ongelmat tai ainakin heikentää kasvaimen elinvoimaa (Liberti and Locasale, 2016). Normaalisti kasvutekijöistä riippuvainen solu tuottaa ensisijaisesti ATP-energiaa oksidatiivisen fosforylaation avulla, kun taas syöpäsolulle anaboliset reaktiotiet ovat erityisen tärkeitä (kuva 2). Aerobisen glykolyysin on todistettu tehostavan makromolekyylien biosynteesiä, myrkyllisten happiradikaalien hajotusta ja solun redox-tasapainon ylläpitämistä. Glukoosin ohella glutamiini on erityisen tärkeä yhdiste, joka toimii nukleotidien, heksoamiinien ja ei-välttämättömien aminohappojen prekursorina. Typpiä luovuttamisen lisäksi glutamiinin hiilirunko voidaan hyödyntää sitruunahappokierroksen välituotteiden synteesissä. Näiden välituotteiden synteesi tehostaa rasvahappojen, NADPH:n, ei-välttämättömien aminohappojen sekä nukleotidien biosynteesiä. Glutamiinin

deaminaatio glutamaatiksi mahdollistaa myös happiradikaalien hajotusta tehostavat glutatioonin synteesin, sekä glutaminolyysin, jonka avulla voidaan muodostaa lisää laktaattia ja hapettavia NAD<sup>+</sup>-molekyylejä (Cantor and Sabatini, 2012).



Kuva 2. Syöpäsolussa glukoosin ja glutamiinin hyödyntäminen biomolekyylien synteesiin on tehostunut. Glukoosin reaktioreitti pyruvaatiksi tuottaa erityisesti nukleotidien biosynteesiin tarvittavia prekursoreita. Pentoosifosfaattireaktioreitti (PPP) voi olla oksidatiivinen, jossa riboosi-5-fosfaatin (R5P) lisäksi tuotetaan glukoosi-6-fosfaatista (G6P) NADPH:ta. Ei-oksidatiivisessa PPP:ssa tuotetaan fruktoosi-6-fosfaatista (F6P) ja glyseraldehyde-3-fosfaatista (GADP) tuotetaan ainoastaan riboosi-5-fosfaattia. Seriinin synteesireitti 3-fosfoglyseraattia (3PG) tehostaa ei-joidenkin aminohappojen hiilirunkojen sekä fosfolipidien biosynteesiä. Dihydroksiasetoni-fosfaatti (DHAP) tehostaa fosfolipidien ja triasyyliglyserolien synteesiä. Glykolyysin lopputuote pyruvaatti voidaan edelleen muuttaa laktaatiksi tai transaminoida alaniiniksi. Sitruunahappokierron välituotteiden hiilirungot voivat olla peräisin myös glutamiinilta, joka voidaan vaihtoehtoisesti hyödyntää suoraan glutamaatin ja  $\alpha$ -ketoglutaraatin prekurSORina tai nukleotidien typpiätomien lähteenä. Glutamiinia voidaan hyödyntää myös rasvahappojen biosynteesissä sitraatin kautta, kuten myös glykolyysistä peräisin olevaan pyruvaatin avulla syntetisoitua asetyyli-koA:ta (Acetyl-CoA). Oksaloasetaatista saadaan aspartaattia nukleotidien biosynteesiin. Malaatti voidaan kuljettaa mitokondriosta sytoplasman puolelle ja muuttaa glutaminolyyysin avulla laktaatiksi ja NADPH:ksi. Aerobinen glykolyysi mahdollistaa myös pienen ATP-tuoton sytoplasmassa. Tieto ja kuva peräsin (Cantor and Sabatini, 2012).

### 3.2. Metabolisten reittien uudelleenohjelmointi

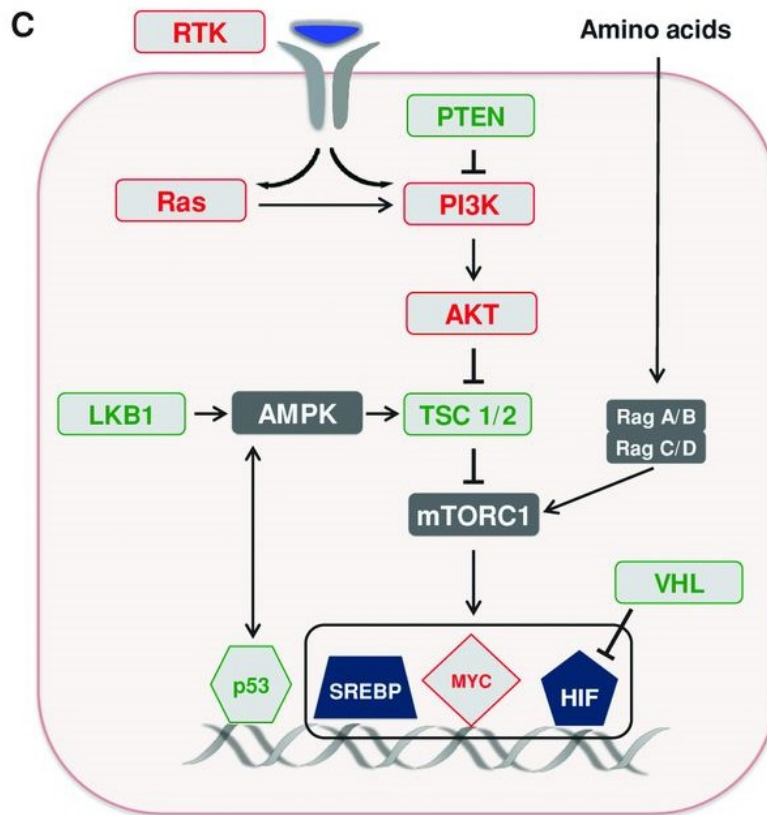
Tutkijoita on kiinnostanut erityisesti tyypin 1 PI3K-signaalireitti (kuva 3), joka käsittää moninaisen joukon solun kasvua aktivoivia ja rajoittavia signaalimolekyyliä lähtien solukalvon reseptorien aktivoinnista. Useimmat syöpätyypit karakterisoivat muutoksia tässä reaktiivissa, joka normaalisti ohjaisi solun kasvua ja kehitystä hallitusti. Kyseisiä fosfoinositidi-

3-kinaaseja (PI3K) on kolmea eri tyyppiä, joista ensimmäinen tyyppi on jaettu vielä kahteen luokkaan; A ja B. Luokittelun perusteena on entsyymien katalyyttisen alayksikön ja säätelyyn tarkoitetun alayksikön rakenne-erot. Säätelyyn tarkoitetun alayksikön tehtävänä on sitoutua insuliinireseptorin substraatin adaptoriproteiiniin tai suoraan aktivoituun tyrosiinikinaasi-reseptoriin (Cheng et al., 2009). Entsyymien toimesta fosforyloitu fosfatidyli-inositoli-3,4,5-fosfaatti (PIP<sub>3</sub>) aktivoi esimerkiksi Akt-välitteisen signaalireitin, jonka tuloksena solun glykolyysi tehostuu. Glykolyysin tehostumisen taustalla on glukoositransportteireiden translokaatio sekä glykolyyttisten entsyymien aktivointi postranskriptionaalisten modifikaatioiden avulla. On mahdollista, että seriini/threoniini kinaasi Akt ehkäisee syöpäsolujen apoptoosia edistämällä glukoosin käyttöönottoa ja glykolyysiä (Rathmell et al., 2003).

Akt aktivoi myös säätelytekijää nimeltä rapamysiini kompleksi 1 (mTORC1) fosforyloimalla kompleksin kahta mahdollista inhibiittoria. Kyseisten inhibiittorien aktivointi on mahdollista AMP-aktivoitulla kinaasilla (AMPK), joka puolestaan aktivoituu esimerkiksi tuumorisuppressorin nimeltä maksakinaasi B1 (LKB1) avulla. AMPK inhiboi mTORC1:sta, sillä kyseisen kinaasin aktivoituminen viestii esimerkiksi solun huonosta energiatilasta tai hapenpuutteesta (Cantor and Sabatini, 2012). mTORC1:sen tehtävä on muun muassa lisätä syöpäsolun lipogeneesia, pro-onkogeenien transkriptiota sekä ribosomien biogeneesiä, mitkä ovat yleisesti toiminnassa hyvässä solun energiatasapainotilassa (Laplane and Sabatini, 2012). Vaikka mTORC1:sen poikkeuksellinen aktiivisuus edistää syöpäsolujen selviytymistä, LKB1:sen ja AMPK:n aktiivisuuksilla on havaittu olevan tärkeä merkitys apoptoosin välttämiseksi ATP-varastojen tyhjentymistä. Normaalista LKB1 ja AMPK edistävät energiaa tuottavia reaktioreittejä ja inhiboivat energiaa kuluttavia reaktioreittejä, kuten uusien makromolekyylien synteesiä. Kyseisten kinaasien aktiivisuus kasvaa AMP-pitoisuuden kasvaessa ja ATP-pitoisuuden laskiessa. Syöpäsoluissa tuumorisuppressoreiden toiminta on usein estynyt, jolloin solun kasvua ei rajoiteta. Tällöin on mahdollista, että AMP-pitoisuus kasvaa hälyttävän suureksi ja solu ajautuu apoptoosiin. Tutkimuksissa on havaittu, että sopiva LKB1:sen aktiivisuuden lasku edistää tuomorigeneesiä, mutta proteiinin puuttuminen kokonaan voisi jopa haitata syövän kasvua ja selviytymistä energiavajeen aikana. Koejärjestelyissä monet solutyypit, joissa ei ollut maksakinaasi B1:sta ja jotka käsiteltiin AMP:n analogilla AICAR:illa, ajautuivat apoptoosiin. Kyseiset solut, joista puuttui LKB1:sen lisäksi AMPK, ajautuivat apoptoosiin vielä nopeammin, sillä mTORC1:sen aktivoimia anabolisia reaktioreittejä ei kyetty inhiboimaan AMP-tasojen noustessa (Reuben J. Shaw et al., 2004). AMP sitoutuu suoraan AMPK:n  $\gamma$ -alayksikköön, jonka seurauksena maksakinaasi B1 pystyy fosforyloimaan katalyyttisen  $\alpha$ -alayksikön. Solussa on havaittu muitakin aktivoivia kinaaseja, kuten kalmoduliini-riipuvainen proteiinikinaasi  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) sekä TGF- $\beta$  aktivoitu kinaasi 1 (TAK1). Myös

fruktoosi-1-6-bisfosfaatin (FBP) puuttuminen lysosomin kalvolta mahdollistaa AMPK:n fosforylaation maksakinaasi B1:sella. Tällöin AMP ei ole ainoa reaktioreitin säätelymolekyyli, vaan glukoosipitoisuus itsessään viestii suoraan solun energiavajeesta. AMPK edistää erityisesti mitokondrioiden oksidatiivista fosforylaatiota, minkä perusteella AMPK on ajateltu hidastavan syöpäsolujen kasvua sytoplasman glykolyysin tehokkuuden laskiessa. Syöpäsoluilla glykolyysi toimii jopa 200 kertaa tehokkaammin, kuin normaalisti oksidatiiviseen fosforylaatioon panostavilla soluilla. Kuten aikaisemmin jo todettiin, LKB1/AMPK inhibointi edistää syöpäsolujen kasvua tiettyyn pisteeseen asti, mutta voi myös edistää syöpäsolujen apoptoosia solun stressitasojen noustessa liian korkeiksi (Jiang et al., 2019).

Fosfataasi ja tensin homologi (PTEN) on toinen tärkeä tuumorisuppressori, joka säätelee PI3K/Akt-signaalireitin jatkumista hyvin pian aktivoivan signaalin vastaanottamisen jälkeen. Toimiessaan oikein PTEN mahdollistaa kontrolloidun solun kasvun ja jakaantumisen estämällä Akt-välitteisen signaalireitin alkamista defosforyloimalla  $PIP_3$ -yhdisteen takaisin  $PIP_2$ :seksi. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kyseinen proteiini puuttuu vain noin 25% syöpätyypeistä, vaikka sen toiminta on estynyt laajasti useissa eri syöpätyypeissä. Oletuksena on, että solut pystyvät ekspressoimaan toimivan proteiinin, mutta sen translaation jälkeisessä modifikaatioissa tapahtuu suurin osa sen toimimattomuuteen vaikuttavista muutoksista. Vielä on epäselvää, mitkä mahdollisista muutoksista aiheuttavat proteiinin toimimattomuuden tai epästabiiliuden fysiologisissa olosuhteissa, vaikka kliinisissä tutkimuksissa jonkinlainen käsitys mahdollisista modifikaatioista ja entsyymien aktiivisuuden säätelystä on jo saatu (Lee et al., 2015).



Kuva 3. PI3K-signaalireitti, joka normaalisti säätelee solun kasvua ja jakaantumista. Syöpäsoluissa kyseinen signaalireitti ja muuntunut tehostamaan syöpäsolun kasvua onkogeneenien aktivoituttua ja tuumorisuppressoreiden inaktivoituttua. Tyrosiinikinaasi-reseptori (RTK), Ras, fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K), Akt ja transkriptiofaktori Myc on merkitty kuvaan punaisella värillä, joka tarkoittaa niiden toimivan onkogeeneinä. PTEN, maksakinaasi B1 (LKB1), p53, TSC1/2 ja VHL toimivat tuumorisuppressoreina, ja on merkitty kuvaan vihreällä. SREBP sekä HIF toimivat transkriptiofaktoreina anabolisille reaktioreiteille mahdollistaen tuumorigeneesin. mTORC1 aktivoi kyseisiä transkriptiotekijöitä. Kuvasta nähdään, että aminohappojen muodostamat Rag A/B ja Rag C/D kompleksit aktivoivat mTORC1:sta. Tieto ja muokattu kuva peräsin (Cantor and Sabatini, 2012)

### 3.2.1. c-Myc transkriptiotekijät

PI3K-signaalireitin vasteena MYC onkogeenin koodaama transkriptiofaktori c-Myc pystyy edistämään tuumorigeneesiä aktivoimalla useiden eri geenien luentaa ja vaikuttamalla solun jakaantumiseen. Normaalisti p53 ja Arf estävät kyseisen transkriptiotekijän toimintaa ulkoisten kasvua rajoittavien signaalien vasteena. c-Myc pystyy sitoutumaan jopa 30 % kaikista geenien promoottorialueista, mutta tarvitsee muita spesifisiä transkriptiotekijöitä geenien luennan aloittamiseksi. Proteiinilla on havaittu olevan kaksi rakenteellista motiivia, jotka mahdollistavat sen toiminnan. Toinen niistä on heliksi-loop-heliksi (HLH) -motiivi, joka sitoutuu spesifiseen DNA-jakson leveämpään uurteeseen. Toinen motiivi on rakenteeltaan leusiini-vetoketju, joka sitoutuu transkriptiofaktoriin Max. Muodostunut kompleksit voi myös estää geenien luentaa, jos siihen liittyy vielä Miz-1-transkriptiotekijä. On arvioitu, että jopa 40 % muodostu-

neista syöpäkasvaimista karakterisoi lisääntyntä aktiivisuutta kyseisessä transkriptiofaktorissa, mikä osittain kertoo kohdegeenien ekspressoimisen tärkeydestä syövälle. Kohdegeenit koodaavat ribosomien ja mitokondrioiden biosynteesiä edistäviä proteiineja, sekä rasvahappojen, nukleotidien ja glukoosin metaboliaa edistäviä proteiineja (Dang et al., 2009). Rasvahappojen ja kolesterolin lisääntyneeseen synteesiin vaikuttaa sitruunahappokierron entsyymien, sitraatin ja lipogeneesiin vaadittavien useiden entsyymien; ATP-energiaa vaativan sitraattilyaasin (ACLY:n), asetyyli-KoA karboksylaasi alphan (ACACA:n), rasvahapposyntaasin (FASN) sekä stearoyyli-KoA desaturaasin (SCD:n) tehostunut tuotanto. Nukleotidien synteesiin vaikuttaa tehostunut pentoosifosfaattireaktiotie sekä seriinin, glysiinin ja folaatin reaktioreitti, joka toimii pääsääntöisesti mitokondrion entsyymien avulla. Puriinien ja pyrimidiinien synteesireitin entsyymien tuotanto on myös tehostunut (Stine et al., 2015). Tutkimukset ovat osoittaneet, että c-Myc lisää ainakin laktaattidehydrogenaasi A:n (LDHA), glukoo-sitransportteri 1:sen (GLUT1), enolaasi 1:sen (ENO1), heksokinaasi 2:sen ja fosfofruktoki-naasin (PFKM) transkriptiota. Kyseisten glukoosin metaboliaa edistävien entsyymien toiminta on aktivoitavissa myös hypoksian indusoiman transkriptiotekijän HIF-1 avulla. Solun happipitoisuuden ollessa hyvä, c-Myc edistää aerobista glykolyysiä sekä mahdollisesti mitokondrioiden oksidatiivista fosforylaatiota energiatasapainon ylläpitämiseksi. Tutkimusten mukaan transkriptiofaktorin aktivoiminen edistää mitokondrioiden biosynteesiä ja toimintaa, sekä mahdollistaa pyruvaatin hapettamisen asetyyli-KoA:ksi sitruunahappokiertoa pyruvaattidehydrogenaasin (PHD) avulla. Hypoksiassa kyseinen reaktioreitti on inhiboitu, sillä HIF-1 ja c-Myc yhdessä lisäävät pyruvaattidehydrogenaasi kinaasi 1:sen (PDK1) geenin luentaa (Dang et al., 2009).

Glukoosin metaboliareittien lisäksi glutamiinin metaboliareitit ovat tehostuneet c-Myc aktivoituissa soluissa, sillä esimerkiksi glutamiinin transporttereiden ASCT2:sen ja SLC7A25:sen sekä glutamiinin hajoamista säätelevien entsyymien luenta on lisääntynyt (Dang et al., 2009). On esitetty, että PI3K/Akt-signaalireitti ei itsessään edistä glutamiinin hyödyntämistä solun bioenergeettisenä raaka-aineena. Esityksen taustalla on tutkimus, jossa PI3K-signaalireitin inhiboiminen ei hidastanut glutaminolyysiä, vaan ainoastaan glukoosin metaboliareittejä. Toisaalta, c-Myc transkriptiotekijän aktiivisuudella on suora yhteys glutamiinin metaboliareitteihin, sillä lentiviruksella tehty lähes toimimaton proteiini (shMYC) SF188-soluissa vähensi merkittävästi solujen glutamiinin käyttöönottoa ja ammoniakkin tuottoa. Kaikki syöpätyypit eivät kuitenkaan ole riippuvaisia glutamiinista, vaan ainoastaan glukoosista. Tämän on ajateltu johtuvan c-Myc aktivoitujen solujen erilaisesta metaboliasta, mikä vaatii glutamiinin hiilirunkojen läsnäoloa anapleroottisten reaktioreittien ylläpitoon vahvistaakseen oksidatiivisen fosforylaation tehokkuutta. Glutamiinin hiilirunkon hyödyntäminen

kyseisiin reaktioreitteihin on suhteellisen pieni, mutta kuitenkin suurempi, kuin ei-transformoiduissa soluissa. Glutamiinista peräisin oleva  $\alpha$ -ketoglutaraatti on myös syöpäsoluille erityisen tärkeä yhdiste, sillä se lisää syöpäsolujen selviytymistä glutamiinin puuttuessa tai aminoksyasetaatin (AOA) läsnäollessa c-Myc aktivoiduissa soluissa. Aminoksyasetaatti toimii inhibiittorina transaminaaseille, jotka muodostavat glutamaatista  $\alpha$ -ketoglutaraattia. Tulokset osoittavat, että glutamiinin aminoryhmän luovuttaminen aminohapoille ei ole soluille tärkein asia.  $\alpha$ -ketoglutaraatti ei luovuta aminoryhmää aminohapoille, mutta sen läsnäolo edistää glutamiinista riippuvien solujen selviytymistä. Solut poistavat ylimääräisen glutamiinin laktaatin tai alaniinin muodossa turvaten samalla pelkistyneiden koentsyymien tarpeen erilaisiin anabolisiin reaktioreitteihin. Yksi syy glutaminolyysin aktivaatioon voisi olla juuri NADPH:n lisääntynyt tarve solun kasvaessa tehokkaammin kuin normaalisti. Tutkimuksissa on havaittu, että aerobiseen glykolyysiin panostavat solut tuottavat riboosin ja nukleotidinsa ei-oksidatiivisen pentoosifosfaattireaktoreitin avulla. Tällöin NADPH ei regeneroidu ilman esimerkiksi glutaminolyysin läsnäoloa (Wise, David R. et al., 2008).

### ***3.2.2. HIF-1 transkriptiotekijät***

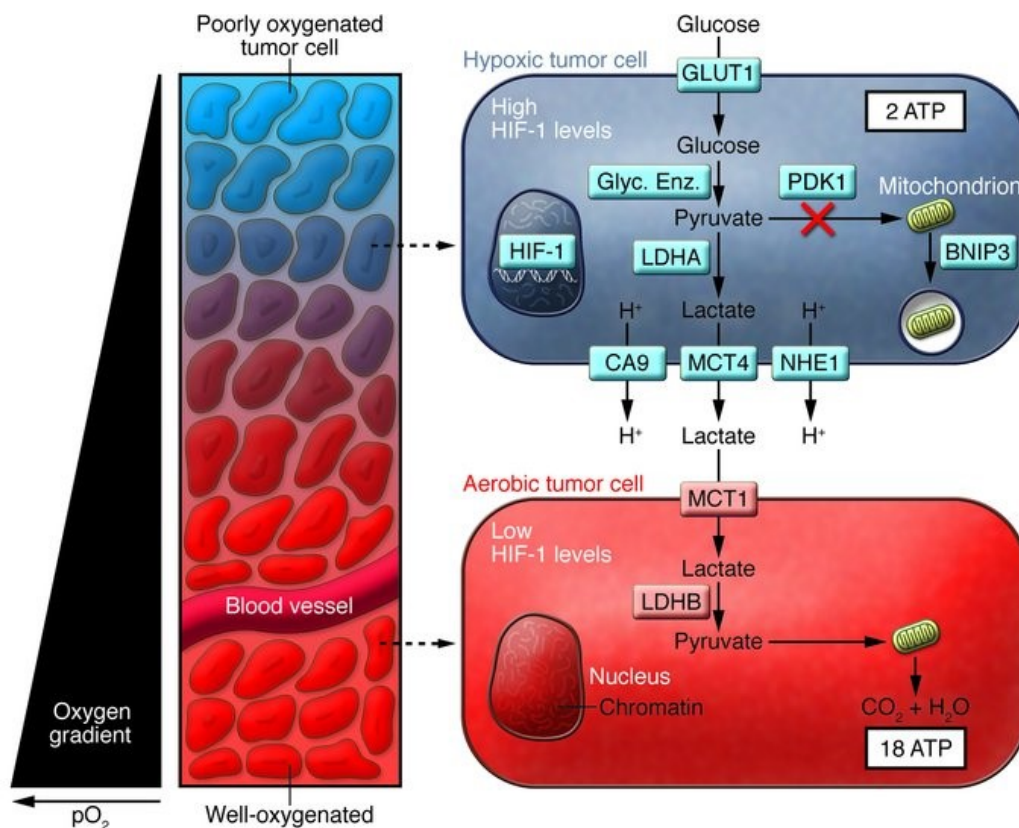
Tutkimukset ovat osoittaneet, että noin 60 % kiinteistä kasvaimista kärsivät hapenpuutteesta. Kasvaimen osat, jotka sijaitsevat kauempana verisuonista voivat kärsivä tilapäisestä hypoksiasta, sillä lähempänä verisuonitusta olevat solut hyödyntävät suurimman osan veren hapestasta. Laajentuneen kasvaimen sisällä voi olla myös alueita, jonne happi ei pääse diffundoitumaan, jolloin kasvain kärsii kroonisesta hypoksiasta. Kasvaimen sisällä käynnistyvät HIF-tekijät eli hypoksian indusoimat tekijät, jotka auttavat solua sopeutumaan aktivoimalla tiettyjen geenien luentaa. HIF-tekijät toimivat heterodimeereinä, sillä hapestasta riippuvainen  $\alpha$ -alaysikkö ja hapestasta riippumaton  $\beta$ -alaysikkö muodostavat kompleksin tumassa. Kompleksin tehtävänä on sitoutua geenien promoottorialueille, joissa on tiettyjä hypoksiaan reagoivia elementtejä (HREs). Sitoutuminen aktivoi useampien kohdegeenien luentaa, mikä edesauttaa syövän kasvun ja leviämisen mahdollisuuksia. Ihmisellä on löydetty kolme HIF- $\alpha$  proteiiniperheeseen kuuluvaa proteiinia, joista HIF-1 $\alpha$  merkitys syövälle on parhaiten ymmärretty. Hapen läsnäollessa prolyylihydroksylaasit (PHDs) hydroksyloivat HIF-1 $\alpha$ :n, mikä aiheuttaa sen sitoutumisen tuumorisuppressoriin nimeltä von-Hippel Lindau (VHL). Kyseinen kompleksi kuljettaa alaysikon proteasomille hajotettavaksi. Tällöin HIF-1 $\alpha$  ei kulkeudu tumaan, vaan hajotetaan sitä mukaan, kun sitä ekspressoidaan. VHL:n vähentynyt aktiivisuus hapettomien olosuhteiden lisäksi happirikkaissa olosuhteissa aiheuttaa alaysikon kertymistä soluun. HIF:a inhi-

boiva tekijä (FIH) vähentää osaltaan myös HIF-1 $\alpha$ :n aktiivisuutta hydroksyloimalla 803. asparagiinin sen rakenteesta. HIF-1 $\alpha$  määrää lisääviä tekijöitä ovat insuliini, insuliinin kaltaiset kasvutekijät IGF-1 ja IGF-2, pyruvaatti, laktaatti, virusperäinen sarkoomageeni (v-Src) sekä muut onkogeenien ja tuumorisuppressorien geneettiset muutokset (Balamurugan, 2016). HIF-2 vaikuttaa erityisesti solujen rasvakoostumukseen ja punasolujen hapen kuljetukseen, ja on herkempi insuliinin vasteille kuin HIF-1 (Koivunen and Kietzmann, 2018). Tutkimuksissa on myös todettu, että eri kinaasien aktiivisuus vaikuttaa suoraan ja epäsuoraan HIF-tekijöiden toimintaan hapen läsnäolosta riippumatta. Kinaaseja aktivoivia solun ulkoisia viestimolekyyliä on myös monia, kuten erilaiset hormonit, sytokiinit ja stressi-stimulit. Vaikka säätely on moninaista, se kohdistuu proteiinin liikkuvaan  $\alpha$ -alaysikköön (Kietzmann et al., 2016).

HIF-transkriptiotekijät voivat edistää tuomorigeneesiä kahdella merkittävällä tavalla. Ensinnäkin HIF-1 voi edistää muun muassa verisuonten endoteelin kasvutekijöiden (VEGF) geenien luentaa. Useiden eri kasvutekijöiden ekspressoiminen johtaa angiogeneesiin aktivoimiseen, mikä turvaa kasvaimen solujen ravintoaineiden ja hapen saannin sekä mahdollistaa etäpesäkkeiden muodostamisen. Hapen kuljettamisen säätelemiseksi esimerkiksi erytropoietiinin, transferriinin, endoteliini-1:seen, typpioksidisyntaasin sekä hemioksidaasin synteesit ovat lisääntyneet. Toiseksi, HIF-1 voi toimia transkriptiotekijänä usealle glykolyttiselle entsyymille ja glukoositransportterille. Tällöin solut pyrkivät sopeutumaan hapettomiin olosuhteisiin (Zhong et al., 1999). Solukalvon MCT4-proteiinilla on geenialue, jonne HIF-1 voi sitoutua. Kyseisen transportterin aktiivisuuden lisääntyessä solun glykolyysi tehostuu entisestään, sillä laktaasin synteesiin tarvittavaa pyruvaattia on enemmän saatavilla. Monilla aggressiivisilla syöpäsoluilla on havaittu lisääntynyt MCT4-aktiivisuus, minkä vuoksi transportterin inhibiittoreita on kehitelty yhdeksi syövän hoitomenetelmäksi. Monokarboksylaatti-transportteireiden inhiboiminen estäisi solujen välisen laktaattisukkulan toiminnan, joka yhdistää hapestasta riippumattomien ja hapestasta riippuvien solujen metaboliareitit (kuva 4) (Jones and Morris, 2016). Esimerkiksi MCT1:sen kuljettavat laktaattia endoteelisoluihin edistäen HIF-1 aktivaatiota ja angiogeneesiä. Transkriptiotekijän aktivoiminen tapahtuu laktaatista saadun pyruvaatin avulla. Pyruvaatti kilpailee  $\alpha$ -ketoglutaraatin kanssa sitoutumisesta PHD2:een. Kun pyruvaatti sitoutuu PHD2:een, HIF-1 ei ohjautu hajotukseen, vaan kulkeutuu tumaan aktivoiden geenien, kuten VEGF-reseptorin, luentaa (Sonveaux et al., 2012). HIF-1 lisää soluväliaineen happamoitumista edistämällä NHE1:sen ja Ca<sup>9</sup>:sen synteesiä. Molemmat solukalvon proteiinit edistävät protonien eritystä soluvälitilaan, joko natriumin ja vedyn vaihdon välityksellä tai solukalvon entsyymiaktiivisuuden välityksellä, josta jälkimmäinen tavataan Ca<sup>9</sup>-proteiinilla



(Samanta and Semenza, 2018). Insuliinin kaltaisen kasvutekijän 2 (IGF-2) ja insuliinin kaltaisen kasvutekijän komplekseihin sitoutuvien proteiinien 2 ja 3 synteesit ovat myös aktivoituneet (Zhong et al., 1999) .



The Journal of  
Clinical Investigation

Kuva 4. Hapen läsnäolo säätelee HIF-1 aktiivisuutta soluissa. HIF-1 aktivoituu vähähappisissa ympäristöissä eli soluissa, jotka sijaitsevat kauempana verisuonista. Se edistää solujen selviytymistä stressitilassa, jossa metabolian reitit normaalisti hidastuisivat. HIF-1 aktivoi laktaattidehydrogenaasia (LDHA) ja inhiboi pyruvaattidehydrogenaasi kinaasi 1:sta (PDK1). Tällöin glukoosin hiilirunko hyödynnetään oksidatiivisten reaktioreittien tilalta anerobisissa reaktioreiteissa, joissa tuotetaan laktaatin lisäksi pelkistäviä koentsyymejä anabolisiin reaktioreitteihin. Glukoosin ja laktaatin kuljettaminen solukalvojen läpi tehostuu transporttereiden GLUT1, MCT4 ja MCT1 ekspressoimisen tehostuttua. Anaerobisen ja aerobisen syöpäsolun välillä toimii niin sanottu laktaattisukkula, joka edistää laktaatin hiilirungon hajottamista energiantuottoon oksidatiiviseen fosforylaatioon avulla. Solujen välinen tila happamoituu Ca9:sen ja NHE1:sen ekspressoitumisen lisääntymisen vuoksi. Kuva ja tieto peräisin (Semenza, 2008).

Tutkijoita on kiinnostanut erilaiset syöpäsolut, jotka kykenevät jakaantumaan vähähappisissa ympäristöissä. Energiantuotannon lisäksi solut tarvitsevat sitruunahappokier-  
ron välituotteita anabolisiin reaktioreitteihinsä. Eräässä tutkimuksessa tutkittiin pahanlaa-  
tuosen glioblastooman SF188 soluja ja niiden sitraatin synteesireittejä. Tutkimuksessa havait-  
tiin, että 21 % happipitoisuudessa solujen sitraatti syntetisoitiin pääasiassa glukoosin hiilirun-  
gosta. Glukoosin hiilirunko hyödynnettiin pyruvaatille, joka edelleen muutettiin asetyyli-  
koA:ksi pyruvaattidehydrogenaasin (PHD) avulla. Asetyyli-koA kulkeutui mitokondrioon

muodostaen oksaloasetaatin kanssa sitraattia sitraattisyntaasin toimiessa. Mitokondrion oksaloasetaatti oli peräisin glutamiinilta, joka oli hapetettu koentsyymien avustuksella. Tällöin solun sitruunahappokierto toimi tehokkaasti ja makromolekyylien synteesi oli mahdollista. Kuten aikaisemmin todettiin, hypoksiassa glukoosin hiilirunko ajautuu kauemmaksi mitokondrion synteesireiteiltä, sillä se hyödynnetään laktaatin synteesiin. Tutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että 0,5 % happipitoisuudessa solut pystyivät tuottamaan 75 % solun normaalista sitraattipitoisuudesta. Glukoosin hiilirunko korvattiin glutamiinin hiilirungolla, joka muutettiin ensin  $\alpha$ -ketoglutaraatiksi, joka edelleen karboksyloitiin mitokondrion isositraatti-dehydrogenaasi 2:lla (IDH-2) isositraatiksi. Hypoksiassa solut eivät ole riippuvaisia glukoosin hiilirungosta sitruunahappokierron välituotteiden synteesiin, sillä  $\alpha$ -ketoglutaraatin läsnäolo riittää sitraatin synteesin ylläpitoon glutamiinin pelkistävien reaktioreittien seurauksena. Mitokondrion IDH-2:lla on epäilty olevan hyvin suuri merkitys syöpäsoluille, jotka kärsivät hapenpuutteesta kasvu- ja jakaantumisvaiheidensa aikana. Joillakin soluilla on havaittu mutaatioita IDH-1:sen ja IDH-2:sen aktiivisissa keskuksissa, mikä aiheuttaa  $\alpha$ -ketoglutaraatin metaboliitin 2-hydroksiglutaraatin (2HG) kertymisen soluihin ei-karboksylaatioreaktion kautta. Hypoksiassa mitokondrion lisääntynyt NADH-pitoisuus lisää NADPH:n synteesiä, joka puolestaan edistää IDH-2:sen toimintaa.  $\alpha$ -ketoglutaraatin pelkistävät karboksylaatiot tuottavat sitraatin lisäksi oksaloasetaattia, malaattia ja fumaraattia. Tutkimuksessa hiilirunkojen alkuperän selvittämiseen hyödynnettiin kaasukromatografia-massaspektometriaa (CG-MS). Kyseiset pelkistävät reaktioreitit luultavasti vähentävät reaktiivisten happiradikaalien kertymistä, sillä ne hyödynnöivät mitokondrion vapaita elektroneita (Wise, D. R. et al., 2011). Vaarallisten happiradikaalien muodostuminen on voimakkaampaa nopeasti kasvavilla ja jakaantuvilla syöpäsoluilla. Tutkimuksissa on havaittu, että kohtuullinen määrä happiradikaaleja edistää tuumorigeneesiä aktivoimalla useita transkriptiofaktoreita. Liian suuri määrä kuitenkin edistää syöpäsolujen apoptoosia vaurioittamalla solujen mitokondrioita ja solujen toimintaa. Happiradikaalien laatu, määrä ja sijoittuminen solussa vaikuttavat tuumorigeneesiin eri tavoilla (Lebelo et al., 2019).

### 3.3. Syöpäsolujen laktaattisynteesin säätelystä

Edellä mainitut transkriptiotekijät c-Myc ja HIF-1 vaikuttavat laktaattidehydrogenaasin aktiivisuuden lisääntymiseen solun epäsuoran signaalireitin vasteina. Jokin ulkoinen signaalimolekyyli aiheuttaa G-proteiini välitteisen signaalireitin aktivoitumisen, missä on useampia mahdollisia osatekijöitä ja vasteita. Tumassa transkriptiotekijöiden aktiivisuuksien säätely on melko hidasta, ja mahdollistaa solun sopeutumisen muuttuneeseen ympäristöön tietyn ajan

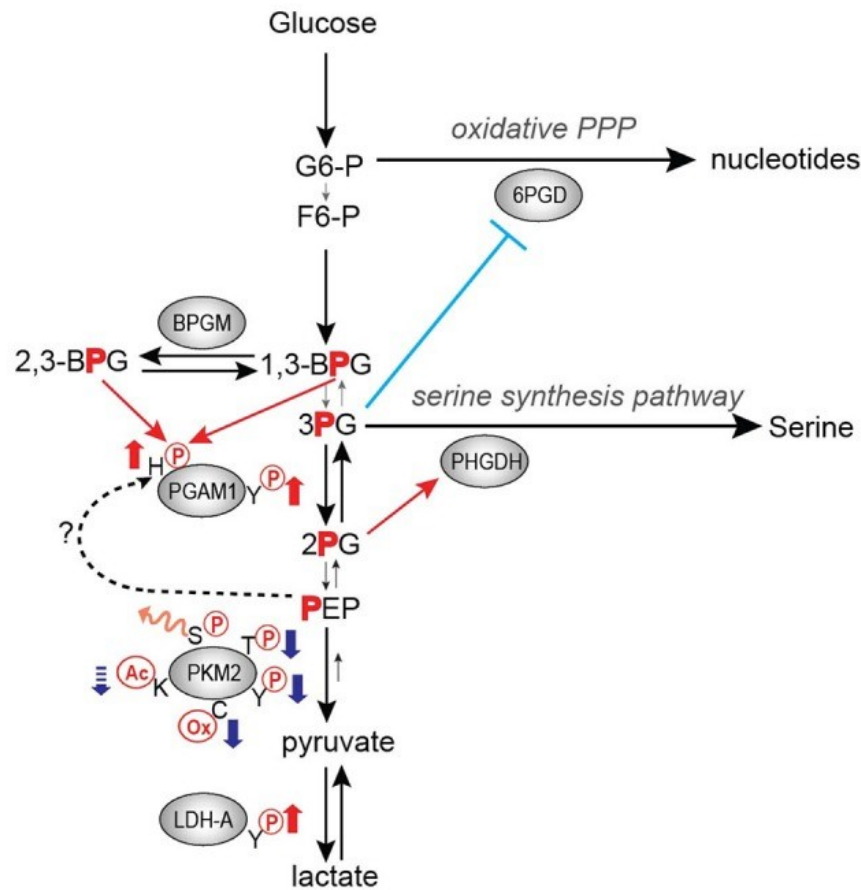
kuluessa. Proteiinien transkriptio, translaatio ja mahdollisesti modifioiminen vie aikaa, jota solu ei aina pysty odottamaan. Siksi syöpäsolussa on esimerkiksi mutatoituneita reseptoreita, jotka kykenevät säätelemään entsyymien aktiivisuuksia hyvin nopeasti. Säätely perustuu reseptoreiden kykyyn fosforyloidä tiettyjä entsyymien aminohappoja. Onkogeeniset solukalvon kinaasi-reseptorit toimivat syöpäsoluissa usein liian aktiivisesti, jolloin alavirran entsyymit ovat jatkuvasti toiminnassa.

### ***3.3.1 FGFR1-tyrosiinikinaasi-reseptori***

Laktaattidehydrogenaasi A:n toimintaa tutkittaessa huomattiin, että onkogeeninen tyrosiinikinaasi-reseptori FGFR1 fosforyloi suoraan Y10 ja Y83 LHD:n aminohappoketjusta ja mahdollistaa entsyymin aktiivisen tetrameerisen rakenteen muodostumisen. Erityisesti fosforyloidun Y83 aminohappotähteen on havaittu sitovan NADH:ta, jota tarvitaan laktaatin synteysiin. Fosforyloidun Y10 aminohappotähteen tehtävänä on luultavasti stabiloida aktiivista tetrameeriä LHD:n rakennetta, sillä substraatin ja koentsyymin sitoutumiskohdat ovat entsyymin rakenteessa kauempana. Kyseinen aminohappo Y10 on fosforyloitu monessa eri syöpätyypissä eri tyrosiinikinaasi-reseptoreiden toimista. Reseptorin kinaasi-aktiivisuudella on merkitys entsyymin aktiivisuuden säätelyssä, sillä esimerkiksi korvaamalla Y10 aminohappo toiseen, laktaattidehydrogenaasi A ei toimi yhtä tehokkaasti. Kyseisen aminohapon mutaatio lisää solujen hapenkulutusta, ja mitokondrioissa tapahtuvaa NAD<sup>+</sup>:n tuottoa. Kyseisen mutaation vuoksi solujen laktaattidehydrogenaasin aktiivisuus on noin 70% villityypin solun entsyymiaktiivisuudesta. Aktiivisuuden lasku johtuu koentsyymien regeneroitumisen hitaudesta, sillä NADH:n kuljetus sytosolista mitokondrioon vaatii enemmän aikaa kuin NAD<sup>+</sup> regeneroiminen sytosolissa. Hypoksiassa kyseiset mutatoituneet solut selviytyvät huonommin kuin ei-mutatoituneet solut, mikä on selitettävissä mutatoituneiden solujen energia-aineenvaihdunnan reittien ohjautumisesta hapesta riippuvaiseen NADH/NAD<sup>+</sup> vaihtoon mitokondrioissa. Tutkimus osoitti, että FGFR1 kinaasi-aktiivisuus LDH:n aminohappoihin Y10 ja Y83 on tärkeä syöpäsolun selviytymisen kannalta, sillä se lisää solujen aerobista glykolyysia ja NAD<sup>+</sup> regeneroitumista sytosolissa. (Fan et al., 2011).

Lisäksi tutkimuksessa huomattiin, että samainen tyrosiinikinaasi-reseptori FGFR1 fosforyloi glykolyysin välivaiheen entsyymiä pyruvaattikinaasi M2:sta (PKM2) aiheuttaen sen aktiivisuuden laskun (kuva 5). Aktiivisuuteen vaikuttava fosforylointi kohdistui aminohappoon Y105. Pyruvaattikinaasi edistää glykolyysin jälkeistä oksidatiivista fosforylaatiota tuottamalla fosfoenolipyruvaatista (PEP) pyruvaattia ATP:n avulla. Toisin sanoen, FGFR1:sen aktiivisuus inhiboi PKM2:sen toimintaa ja näin ollen edistää aerobista glykolyysia

ja syöpäsolujen selviytymistä. Pyruvaatin tuotanto on tärkeää sitruunahappokierron ja oksidatiivisen fosforylaation kannalta, mutta myös laktaatin synteesin kannalta. Soluilla on kuitenkin kyky muodostaa laktaattia vaihtoehtoisia synteesireittejä pitkin hyödyntämällä esimerkiksi glutamiinilta peräisin olevaa hiilirunkoa (Fan et al., 2011). Pyruvaattikinaaseja on neljää eri isoformia; PKL, PKR, PKM1 ja PKM2, joista jälkimmäinen on ekspressoitu lähinnä erilaisumattomassa ja nopeasti jakaantuvassa solutyypissä, kuten syöpäsolussa. Kaksi jälkimmäistä isoformia saadaan vaihtoehtoisen silmukoinnin ansiosta, missä c-Myc ja silmukointitekijä SRSF3 vaikuttavat positiivisesti PKM2:sen muodostumiseen. Pyruvaattikinaasi M2:sen aktiivisuuteen vaikuttaa glykolyysin välituotteen fruktoosi-1,6-bisfosfaatin muodostuminen (FBP), sillä kyseinen molekyyli toimii allosteerisena aktivaattorina PKM2:lle. Entsyymien aktiivisuuteen vaikuttaa lisäksi muita translaation jälkeisiä modifikaatioita aiemmin esitellyn FGFR1:sen kinaasi-aktiivisuuden lisäksi. Kyseisellä reseptori-kinaasilla on vaikutusta juuri entsyymien allosteeriseen aktivaatioon, sillä Y105 fosforyloiminen vähentää FBP:n sitoumista ja aktiiviseen tetrameerin muodostumista. Reaktiiviset happiradikaalit aiheuttavat osaltaan myös entsyymien allosteerisen aktivaation inhibition, ja edistävät syöpäsolujen jakaantumista. Kaikille translaation jälkeisille modifikaatioille on yhteistä niiden negatiivinen vaikutus pyruvaattikinaasi M2:seen johtaen syöpäsolujen tehokkaaseen kasvuun ja jakaantumiseen. Entsyymien substraatin fosfoenolipyruvaatin (PEP) lisääntynyt määrä solussa tukee suoraan glykolyttisen entsyymien fosfoglyseraatti mutaasi 1:sen (PGAM1) aktivaatiota, jota voidaan myös säädellä suoraan eri tyrosiinikinaasi-reseptorien toimesta. Joillakin syöpäsoluilla on havaittu pieni PKM1:sen aktiivisuus PKM2:sen hiljentämisen aikana. Tästä pienestä kinaasi-aktiivisuudesta on havaittu olevan hyötyä syöpäsoluille, sillä se osaltaan ylläpitää pyruvaatin synteesiä ja laktaatin muodostumista. Kiinnostavaa on myös se, että aina PKM2:sen inhibitio ei paranna syöpäsolujen selviytymismahdollisuuksia, vaan voi jopa huonontaa niitä. Kyseisellä kinaasilla on positiivinen vaikutus oksidatiivisen fosforylaation tukemisen lisäksi useampien eri transkriptiotekijöiden, kuten c-Myc ja HIF-1, aktivaatiossa (Wiese and Hitosugi, 2018). Luultavasti PKM2:sen rooli tumorigeneesissä vaihtelee juuri syövän geneettisen taustan ja kasvaimen kasvuympäristön perusteella (Hillis et al., 2018). Kasvuhormonista riippuvainen solun sytoplasmassa toimiva kinaasi ERK2 voi aktivoituessaan edistää PKM2:sen kuljetusta tummaan. Signaalin eteneminen edellyttää kinaasi-aktiivisuuden PKM2:sen Ser37 aminohappoon (Miao et al., 2013). Vasta kun syöpäsolujen PKM2:sen merkitys ja säätelykeinot ymmärretään kunnolla, voi uusien lääkehoitojen kehittäminen ja yksityiskohtainen kohdentaminen olla mahdollista (Wiese and Hitosugi, 2018).



- |              |                          |  |
|--------------|--------------------------|--|
| Y: Tyrosine  | <b>P</b> Phosphorylation | <b>↑</b> Upregulation of enzyme activity   |
| S: Serine    | <b>Ac</b> Acetylation    | <b>↓</b> Downregulation of enzyme activity |
| K: Lysine    | <b>Ox</b> Oxidation      | <b>≡</b> Degradation of enzyme             |
| C: Cysteine  |                          | <b>~</b> Translocation of enzyme           |
| H: Histidine |                          |  |
| T: Threonine |                          |  |

Kuva 5. Laktaatin synteessin säätelystä. LDH-A:n fosforyloiminen FGFR1:sen avulla mahdollistaa aktiivisen tetrameerin-rakenteen muodostumisen ja tehokkaan laktaatin synteessin pyruvaatista. Pyruvaatin synteesi on säädelty syöpäsolujen PKM2:sen kinaasi-aktiivisuuden säätelyn avulla. Säätelyyn vaikuttavat useat translaation jälkeisen muokkaukset esimerkiksi Y105 fosforyloiminen tai kysteiinin (C358) hapettaminen reaktiivisten happiradikaalien kerääntyessä soluun. Kuten kuvasta nähdään, kyseiset muokkaukset vaikuttavat negatiivisesti PKM2:sen aktiivisuuteen edistään aerobista glykolyysiä. PGAM1 voidaan fosforyloida glykolyysin väliaineen fosfoenolipyruvaatin avulla. Fosfaattiryhmän lisääminen PGAM1:seen lisää glykolyyttisten väliaineiden 3-PG:n ja 2PG:n reversiibeliä synteesi-reittiä. Kyseinen entsyymi voidaan aktivoida myös tyrosiinikinaasi-reseptoreiden toimesta, jolloin muodostuu enemmän 2PG:ta ja seriinin ja nukleotidien biosynteesireitit tehostuvat. 3PG inhiboi PPP:n entsyymiä 6PGD:tä, jolloin sen muuttaminen 2PG:ksi lisää välillisesti nukleotidien synteesiä solujen rakennuspalikoiksi. 2PG puolestaan aktivoi seriinin synteesireitin entsyymiä PHGDH:ta. Lyhenteet: FGFR1=fibroblasti-kasvutekijän reseptori 1, PKM2=fosfokinaasi M2, PGAM1= fosfoglyseraatti mutaasi 1, 3PG= 3-fosfoglyseraatti, 2PG=2-fosfoglyseraatti, PPP=pentoosifosfaattireaktiotie, 6PGD=6-fosfoglykonaattidehydrogenaasi, PHGDH=fosfoglyseraattidehydrogenaasi, BPGM=bifosfoglyseraattimutaasi. Kuva ja tieto peräisin (Wiese and Hitosugi, 2018).

### **3.3.2 HER2-tyrosiinikinaasi-reseptori**

Tutkimuksissa on havaittu, että aktiivinen LDHA ei ainoastaan lisää aerobisen glykolyysin tehokkuutta ja solujen energia-aineenvaihdunnan reittien ohjaamista laktaatin synteesiä tukeville reiteille, vaan se edistää myös solujen levittäytymistä ympäröivään kudokseen. Entsyymien aktiivisuuden säätelyssä toimii erityisesti yksi epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EDGF) perheeseen kuuluva reseptori HER2. Signaalin välittäjänä toimii v-src homologi nimeltä Src, joka fosforyloi LDHA:n aminohapon Y10. Kokeessa solujen kykyä muodostaa metastaseja arvioitiin 6-12 tunnin kasvuajan jälkeen, jolloin kyseiset solut olivat kaikki suurin piirtein samassa kasvuvaiheessa. Ilman aktiivista LDHA:ta kyseiset solut eivät kyenneet muodostamaan etäpesäkkeitä yhtä tehokkaasti kuin muut syöpäsolut. Solujen irtaantuessa muusta solumassasta, niiden todennäköisyys edetä ohjelmoituun solukuolemaan kasvoi aktiivisen LDHA:n puuttuessa. Entsyymien aktiivisuuden kontrolloinnissa havaittiin HER2/Scr -signaalireitti, joka on mutatoituessaan erityisesti rintasyövän kehittymisen taustalla. Aikaisemmin esitelty kinaasi-reseptori FGFR1 ei kyennyt aktivoimaan syöpäsolujen etäpesäkkeiden muodostumista, mutta HER2/Scr kinaasi-aktiivisuus edisti entsyymien aktiivisen tetrameerin rakenteen muodostumista kuten FGFR1. Molemmat tekijät, HER2 ja Scr, pystyvät fosforyloimaan suoraan Y10 aminohapon toisistaan riippumatta. Tuloksena entsyymi tuottaa enemmän laktaattia ja vähentää vaarallisten happiradikaalien kertymistä soluihin. Laktaatin tuotanto on juuri syöpäsolujen selviytymisen ja etäpesäkkeiden muodostumisen taustalla, sillä se lisää verisuonten muodostumisen seurauksena tapahtuvaa solujen levittäytymistä laajoille alueille. Laktaatti luo solujen ympäristöstä sopivan metastaasien kehittymiselle esimerkiksi säätelämällä solujen redox-potentiaalia eli solukalvojen yli vallitsevaa jännite-eroa. (Jin et al., 2017)

### **3.4. Soluvälitilan happamoitumien**

Soluvälitilan happamoituminen helpottaa syöpäsolujen paikallista invaasiota, sillä soluvälitilan protonit kulkeutuvat protonigradientin mukaisesti ympäröiviin soluihin aiheuttaen niiden happamoitumisen. Solun sisäisen pH-tasapainon ylläpitäminen on tärkeää normaaleille soluille, sillä niiden metabolian reitit ja entsyymiaktiivisuudet vaativat tietyt olosuhteet toimiakseen. Alhainen pH aktivoi solun ulkoista matriksia hajottavat proteaasit, lisää angiogeneesiä ja alentaa solujen vastustuskykyä syövän antigeeneille. Tällöin syöpäsolujen kasvua ei rajoiteta ja niiden kyky muodostaa etäpesäkkeitä paranee. Syöpäsolujen makrofagien (TAMS) aktiivisuuden kasvu hyödyntää tuumorigeneesiä entisestään (Lebelo et al., 2019). Lisäksi syö-

päsolun tukirangan dynamiikka muuntuu vastaamaan syöpäsolun polarisoitumista ja migraatiota. pH:n aleneminen vaikuttaa suoraan aktiiniin sitoutuviin proteiineihin, jotka ohjaavat solun liikettä, sekä epäsuoraan solun jakaantumista säätelevään proteiiniin CDC42. Solun tarttuminen ja uuden etäpesäkkeen muodostaminen on todennäköistä, sillä tutkimusten mukaan integriinien aktivaatio lisääntyy alhaisessa pH:ssa. Kasvaimen ympäristön happamoituminen viittaa usein huonompaan paranemisen todennäköisyyteen, sillä se lisää solujen mutaatoriskiä sekä syöpäsolujen vastustuskykyä radioterapialle eli sädehoidolle ja kemoterapialle. Alhainen solun ulkoinen pH vähentää kalsiumin kuljetusta soluun, mikä puolestaan inhiboi proteiinikinaasi C:tä ja aktivoi solukalvon P-glykoproteiinia, joka kuljettaa lääkkeitä ulos solusta. Hieman emäksiset lääkkeet jäävät myös mielellään solujen ulkopuolelle, sillä happamampi pH vetää niitä puoleensa. Kolmas esimerkki syöpäsolujen selviytymisen edistämisessä alhaisessa solun ulkopuolisessa pH:ssa liittyy niiden kykyyn korjata säteilyn aiheuttamia DNA-vaurioita muun muassa p53 ekspression lisääntymisen seurauksena. Myös elimistön kyky vastustaa syöpäsolujen leviämistä heikkenee, sillä luonnollisten tappajasolujen (NC) heikkeneminen johtaa T-tappajasolujen vasteen huononemiseen (Peppicelli et al., 2014).

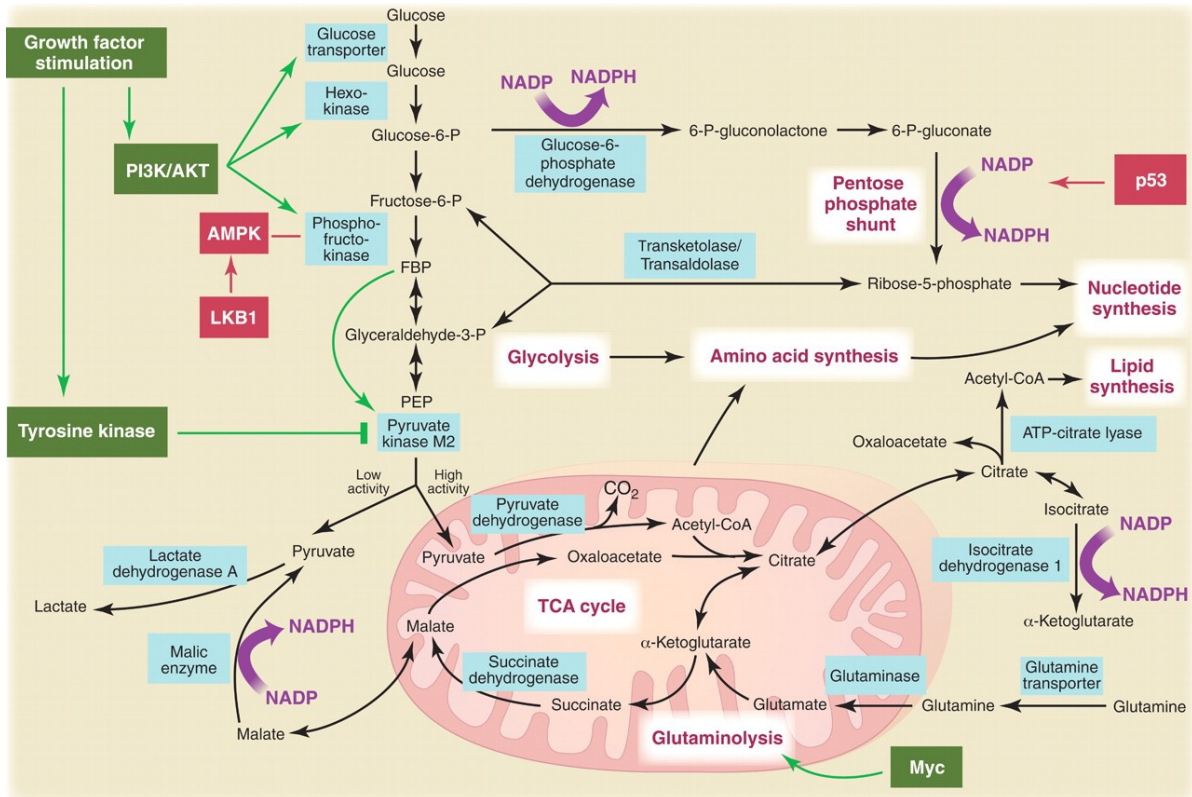
Happamoitumisen lisääntyminen johtuu erityisesti syöpäsolujen runsaasta laktatin tuotannosta (Lebelo et al., 2019). Solut kykenevät hetkellisesti hyödyntämään maitohappoa vapautuneita protoneja esimerkiksi kuljettamalla ne eri organelleihin tai käyttämällä niitä erilaisiin metabolian reaktioihin. Solujen lyhytaikainen puskurointikyky ei kuitenkaan ole yksinään riittävän tehokas. Näin ollen ajan kuluessa solut tuottavat enemmän solukalvon protoneja kuljettavia proteiineja, kuten MCT1 ja 4, anioninvaihtajaproteiinia 1 (AE1) sekä Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-transporttereita (Peppicelli et al., 2014). Aikaisemmin esitelty solukalvon proteiinit Ca9 ja NHE1 ovat erityisen tärkeitä syöpäsolun sytoplasman pH:n säätelijöitä (Lebelo et al., 2019). Ca9:lla on entsyymiaktiivisuus, joka mahdollistaa hiilidioksidin muuntamisen hiilihapoksi reversiibelin hydraation avulla. Solun ulkopuolelle eritettävä hiilihappo happamoittaa solun ulkopuolta pitäen solun sisäpuolen pH:n sopivana. Kyseinen solukalvon proteiini antaa syöpäsoluille merkittävän edun selviytyä. Tutkimuksissa on havaittu, että solun sisäisen pH:n laskiessa, myös NHE1 aktivoituu. Toisaalta Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-pumppu vaikuttaa solun ulkoiseen natriumpitoisuuteen, joka edistää osaltaan NHE1:sen toimintaa. Kyseinen proteiini kuljettaa natriumia solun ulkopuolelta solun sisäpuolelle ja protoneja solun sisäpuolelta solun ulkopuolelle. Samalla NHE1 säätelee solun nestetasapainoa. NHE1:lla on 10-12 hydrofobista transmembraanisekvenssiä, jotka sitovat proteiinin kalvolle. NHE1 toimii monomeerinä, mutta sen dimeerinen rakenne on tärkeä aktivoinnin kannalta. Kalvoproteiinilla on myös silmukoita solukalvon molemmiin puoliin, joista erityisesti solun sisäpuolisilla silmukoilla on proteiinin säätelyn kannalta erityistä merkitystä (Counillon et al., 2016).

## 4. Johtopäätökset

Aikaisemmat johtopäätökset syöpäsolujen metaboliareittien säätelystä ovat muuttuneet Warburgin havainnon kannustamien tutkimusten myötä. Aerobinen glykolyysi ei aktivoidu mitokondrioiden toimimattomuuden seurauksena, vaan useiden muiden syöpäsolujen selviytymistä tukevien synteessireittien perusteella. Aerobinen glykolyysi tarjoaa solulle mahdollisuuden hyödyntää glukoosin ja glutamiinin hiilirunkoja uusien makromolekyylien synteesiin. Laktaatin synteessin taustalla on kyky regeneroida glykolyysiä ylläpitäviä  $\text{NAD}^+$ -molekyylejä. Useat mutatoituneet tyrosiinikinaasireseptorit ja entsyymit, kuten PI3K-signaalireitin alavirran kinaasit, mahdollistavat erityisesti glukoosin talteenoton ja hyödyntämisen makromolekyylien synteesiin. Onkogeenien ja tuumorisuppressoreiden aktiivisuuksien muutokset ovat tiukasti kytkeytyneitä aerobisen glykolyysin tehostumiseen ja tuumorigeneesiin. Hypoksia tukee osaltaan aerobisen glykolyysin aktivaatiota, mutta sen ei oleteta olevan merkittävä syy kyseisen reaktioreitin kehittymisessä syöpäsolussa. Se on ennemminkin seurausta kasvaneen solumassan ympäristötekijöiden muutoksista, kun happea ja ravinteita ei ole enää yhtä vapaasti saatavilla (Vander Heiden et al., 2009). Hypoksia ja soluvälitilan happamoituminen liittyvät usein toisiinsa, sillä niiden taustalla on samat ympäristötekijät. Molemmat ovat merkkejä syöpäsolun mahdollisesta aggressiivisesta levittäytymisestä ympäröivään kudokseen (Pepicelli et al., 2014).

Syöpäsolun metaboliareittien säätely poikkeaa hyvin paljon normaalin solun metaboliareittien säätelystä (kuva 6). Laktaatin tuotannon lisääminen aiheuttaa jo itsessään isoja muutoksia solun toiminnassa. Tutkijat ovat yrittäneet selvittää kaikki mahdolliset yhteyden aineenvaihduntareittien ja solun kasvun ja jakaantumisen välillä, mutta selvittävää vielä on (Vander Heiden et al., 2009). Syövän hoitokeinojen kohdistaminen aineenvaihdunnan osatekijöihin voi olla ratkaiseva tekijä syövän voittamisessa, kunhan ensin eri tekijät tunnetaan (Cantor and Sabatini, 2012).





Kuva 6. Kokoava esitys syöpäsolujen aineenvaihdunnan reittien muutoksista. Syöpäsolun hallitsematon kasvu johtuu useista geneettisen perimän muutoksista, jotka vaikuttavat kasvutekijöistä riippuvaisiin tyrosiinkinasi-reseptoreihin sekä erilaisiin signaalireitteihin. PI3K-signaalireitin vasteena glykolyysin entsyymit aktivoituvat tehostaen aerobista glykolyysiä. Pyruvaatti kinaasi M2:sen inhibiointi vaikuttaa pyruvaatin muuttumiseen laktaatiksi, joka osaltaan lisää solun happamoitumista oksidatiivisen fosforylaation heikentyessä. c-Myc transkriptiotekijä lisää glutaminolyyysiä eli tehostaa sitruunahappokierron entsyymien hiilirunkojen saatavuutta glutamiinilta.  $\text{NAD}^+$  ja  $\text{NADH}$  ovat mukana monissa entsyymaattisissa reaktioissa, joten niiden regeneroiminen on solulle tärkeää. Tuumorisuppressoreiden, kuten LKB1:sen, AMPK:n ja p53 aktiivisuudet ovat vähentyneet, jolloin onkogeeneit, kuten AKT ja Myc vaikuttavat entistä tehokkaammin solun kasvun ylläpitoon. Monilla tekijöillä on monia eri vaikutuksia solun aineenvaihdunnassa, joten esimerkiksi LKB1:sen tai PKM2:sen täydellinen inhibiatio ei välttämättä lisää tuumorigeneesiä jokaisessa solutyypissä. Tieto ja kuva peräsin (Vander Heiden et al., 2009)

## 5. Lähteet

Balamurugan K (2016) HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer* 138(5): 1058-1066.

Brooks GA (2018) The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism* 27(4): 757-785.

Cantor JR and Sabatini DM (2012) Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discovery* 2(10): 881-898.

Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ and Liu P (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 8(8): 627-644.

Counillon L, Bouret Y, Marchiq I and Pouyssegur J (2016) Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> antiporter (NHE1) and lactate/H<sup>(+)</sup> symporters (MCTs) in pH homeostasis and cancer metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1863(10): 2465.

Dang CV, Le A and Gao P (2009) MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. *Clinical Cancer Research* 15(21): 6479-6483.

Doherty JR and Cleveland JL (2013) Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation* 123(9): 3685-3692.

Fan J, Hitosugi T, Chung T, Xie J, Ge Q, Gu T, et al. (2011) Tyrosine Phosphorylation of Lactate Dehydrogenase A Is Important for NADH/NAD<sup>+</sup> Redox Homeostasis in Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology* 31(24): 4938-4950.

Ghiasvand F, Parker D and Robergs RA (2004) Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287(3): R502-R516.

Heino J and Vuento M (2015) *Biokemian Ja Solubiologian Perusteet*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Hillis AL, Lau AN, Devoe CX, Dayton TL, Danai LV, Di Vizio D, et al. (2018) PKM2 is not required for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer & Metabolism* 6(1): 17.

Jiang S, Wang Y, Luo L, Shi F, Zou J, Lin H, et al. (2019) AMP-activated protein kinase regulates cancer cell growth and metabolism via nuclear and mitochondria events. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(6): 3951-3961.

Jin L, Chun J, Pan C, Alesi GN, Li D, Magliocca KR, et al. (2017) Phosphorylation-mediated activation of LDHA promotes cancer cell invasion and tumour metastasis. *Oncogene* 36(27): 3797-3806.

Jones R and Morris M (2016) Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 100(5): 454-463.

Kietzmann T, Mennerich D and Dimova EY (2016) Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 4: 11.

- Koivunen P and Kietzmann T (2018) Hypoxia-Inducible Factor Prolyl 4-Hydroxylases and Metabolism. *Trends in Molecular Medicine* 24(12): 1021-1035.
- Lane AN and Fan TW (2015) Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research* 43(4): 2466-2485.
- Laplane M and Sabatini D (2012) mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149(2): 274-293.
- Lebelo M, Joubert A and Visagie M (2019) Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Archives of Pharmacal Research* 42(10): 833-847.
- Lee M, Jeong M, Lee H, Han H, Ko A, Hewitt SM, et al. (2015) PI3K/AKT activation induces PTEN ubiquitination and destabilization accelerating tumourigenesis. *Nature Communications* 6(1): 7769.
- Liberti MV and Locasale JW (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* 41(3): 211-218.
- Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J and Huang G (2013) Lactate dehydrogenase a in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 65(11): 904-910.
- Peppicelli S, Bianchini F and Calorini L (2014) Extracellular acidity, a “reappreciated” trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy. *Cancer and Metastasis Reviews* 33(2): 823-832.
- Rathmell JC, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson GB and Fox CJ (2003) Akt-Directed Glucose Metabolism Can Prevent Bax Conformation Change and Promote Growth Factor-Independent Survival. *Molecular and Cellular Biology* 23(20): 7315-7328.
- Reuben J. Shaw, Monica Kosmatka, Nabeel Bardeesy, Rebecca L. Hurley, Lee A. Witters, Ronald A. DePinho, et al. (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(10): 3329-3335.
- Samanta D and Semenza GL (2018) Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors. *BBA - Reviews on Cancer* 1870(1): 15-22.
- Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, et al. (2012) Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis. *PLoS One* 7(3): e33418.
- Stine ZE, Walton ZE, Altman BJ, Hsieh AL and Dang CV (2015) MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discovery* 5(10): 1024-1039.
- Vander Heiden MG, Cantley LC and Thompson CB (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324(5930): 1029-1033.
- Wiese EK and Hitosugi T (2018) Tyrosine Kinase Signaling in Cancer Metabolism: PKM2 Paradox in the Warburg Effect. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 79.
- Wise DR, Ward PS, Shay JES, Cross JR, Gruber JJ, Sachdeva UM, et al. (2011) Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate to

support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(49): 19611-19616.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X, Pfeiffer HK, et al. (2008) Myc Regulates a Transcriptional Program That Stimulates Mitochondrial Glutaminolysis and Leads to Glutamine Addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(48): 18782-18787.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. (1999) Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1- $\alpha$  in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Research* 59(22): 5830.